

審査の結果の要旨

氏名阿部 和治

口蓋裂患児の顎裂部への腸骨移植の代替えを目指し、臍帯由来 MSC を骨分化させて、スキャホールドと共に骨芽細胞（3D 骨芽細胞）を移植するための Proof of Concept

（POC）を確立する。そのために、本研究では、臍帯由来 MSC の骨分化能について、増殖と分化という観点から特に細胞周期と骨分化能の関係を検討し、その分化誘導方法を確立することを目的とした。その結果、下記の結果を得ている。

1. 口蓋裂患児 1 例と健常児 4 例の臍帯からエクスプラント法にて MSC を得て、P4 または P5 まで培養し、MSC の性状を比較した。口蓋裂患児と健常児の臍帯由来 MSC 共に細胞はプラスチックディッシュに付着し、表面抗原は CD90、CD73、CD105、CD44 及び HLA-ABC は陽性、CD34、CD11b、CD19 及び HLA-DR は陰性であった。増殖能について、口蓋裂患児臍帯由来 MSC は健常児臍帯由来 MSC と比較して初期増殖に関しては、ほぼ同等に増殖を示したが、増殖限界が低かった。口蓋裂は先天性疾患に合併することも多い為、本患児の染色体検査を実施した結果、染色体異常は認められなかった。また、口蓋裂患児及び健常児臍帯由来 MSC の軟骨芽細胞及び脂肪細胞への分化能は、同等であった。
2. 骨芽細胞への分化誘導においては、臍帯由来 MSC は、骨髄や脂肪由来 MSC に比較して、アリザリンレッド S 染色陽性を示す Ca 沈着は少なかった。この臍帯由来 MSC の骨分化能の低下の一因として盛んな増殖能にあるのではないかと考えた。そこで、増殖を止めるために、FBS を含まない  $\alpha$ -MEM 培地(FBS(-)+ $\alpha$ -MEM)で洗浄後、FBS(+)+ $\alpha$  MEM と FBS(-)+ $\alpha$ -MEM に分けて 1～3 日培養後に、骨分化誘導培地に置換し 4 週間培養した。その結果、FBS(-)+ $\alpha$  MEM の状態で骨分化誘導を行った方が、FBS(+)+ $\alpha$  MEM で培地での培養よりもアリザリンレッド S 染色で染まる Ca 沈着が多く、骨分化能が高かった。一方で、FBS(+)+ $\alpha$  MEM で洗浄したが、すぐに骨分化誘導培地に置換した細胞、すなわち、0 日では、FBS(-)+ $\alpha$ -MEM のみと同等に Ca 沈着が多いが、培養後 1～3 日培養後では、Ca 沈着は非常に減少し骨分化能は劣っていた。FBS(-)+ $\alpha$ -MEM で骨分化能が高かったことから、細胞増殖を停止させること、すなわち細胞周期と関連があるのではないかと予測された。そこで、Cell-Clock 染色法を用いて、臍帯由来 MSC の細胞周期について検討したところ、FBS(+)+ $\alpha$  MEM では、0 日目に G1 期が多くを占め、3 日目に G1 期までに、細胞周期が回転した。一方、FBS(-)+ $\alpha$ -MEM では、G1 期よりも S 期/G2 期/M 期の細胞が多く観察され、3 日目まで S 期/G2 期/M 期の細胞が多く観察され、凝集した死細胞も増加し

た。FBS(-)+ $\alpha$  MEM で洗浄後、洗浄後、FBS を加えて何時間が最も G1 期が多くなるか経時的に細胞周期を観察した。その結果、FBS(+)+ $\alpha$  MEM 培地置換後 1 時間が最も G1 期の細胞が集積していることが分かった。

3. 凍結・解凍した臍帯由来 MSC において、FBS を Off-On することによって、細胞周期をコントロールできる可能性が出た。時間軸や遠心条件を検討した結果、下記の方法を考案した。すなわち、37°C 恒温槽で解凍後の臍帯由来 MSC では様々細胞周期の細胞が混在していたが、FBS(-)+ $\alpha$  MEM に浮遊し、1,000rpm $\sim$ 1,100rpm 10 分 4°C の条件で遠心後、4°C のまま 1 時間 $\sim$ 1 時間 30 分遠心分離機内に静置したところ、ほぼ全て G1 期以外、S/G2/M 期を示した。さらに、遠心分離機から取り出し、クリーンベンチの中で、50mL チューブ内の培地を除去し FBS(+)+ $\alpha$  MEM を入れ、さらに 4°C $\sim$ 常温で 1 時間から 1 時間 30 分静置したところ、ほぼ全ての細胞は G1 期に集束していた (G1 同期法)。
4. 本 G1 同期法も用いて、健常児臍帯由来 MSC を G1 期または G1 期以外 (S/G2/M 期) に同期させた後に骨分化誘導培地を置換し、3 週間培養後、アリザリンレッド S 染色を行った。その結果、G1 期に骨誘導培地に置換した細胞は、G1 期以外の場合に比べて、明らかにアリザリンレッド S 染色陽性の Ca 沈着が多く、骨分化能が高かった。また、口蓋裂患児と健常児臍帯由来 MSC を G1 同期法で、G1 期にした後に、3 週間まで 1 週間ごとに骨分化誘導培地を交換する方法で、骨分化誘導をおこなったところ、両者ともに、アリザリンレッド S 染色陽性の Ca 沈着が増加した。その時の骨分化関連遺伝子の発現を経時的に解析したところ、両者ともに、骨分化誘導初期には、Wnt-5 の上昇を認め後減少に転じる一方、RUNX2 $\cdot$   $\beta$ -Catenin 系は、1 $\sim$ 3 週間まで徐々に上昇した。Cyclin D1 も同様に上昇した。骨髓由来 MSC では、比較的初期に一過性に上昇した。なお、SRY-related high-mobility group box 9 (SOX-9) は、いずれも骨分化誘導下では抑制されていた。Alkaline Phosphatase は、本 MSC では 3 週間まで上昇した。Osteocalcin は、骨分化誘導最終になってようやく上昇した。その発現パターンは両者ともにほぼ同じであった。
5. ノードマウスへの移植のため、アテロコラーゲンゲルに G1 期に同期させた健常児臍帯由来 MSC を播種し、骨分化誘導培地で培養した 3D 骨芽細胞をノードマウスの頭蓋正中中部と肋骨に移植した。3 匹中 1 匹においてアテロコラーゲンゲルとともに移植した。3 か月後、骨芽細胞部分に、新生骨の層板骨及び骨髓の侵入を確認した。移植した 3D 骨芽細胞は、ヒト由来細胞であり、ノードマウスであっても長期に生存したとは考えられず、マウス骨髓の侵入によってヒト骨芽細胞も置換されていったものと考えている。

以上、本論文は、不確実であった臍帯由来 MSC からの骨芽細胞への分化誘導を、特に新たな添加物や遺伝子操作なく、細胞周期という新たな視点で成功させた。特に、増殖盛んな臍帯由来 MSC においては、増殖と分化誘導という大きな二つの方向性を考える上で、細胞周期の重要性が示唆された。その検討過程で、G1 期同期法を発明した。G1 期同期法は、衛生的で、試薬無添加で、簡便で、大量に G1 期に同期できる方法であり、他の組織への分化誘導においても G1 期に同期させることで、誘導効率が上がる可能性がある。

こうした試みはこれまで報告がない。

よって本論文は博士（医学）の学位請求論文として合格と認められる。